

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

25. 3. 2004

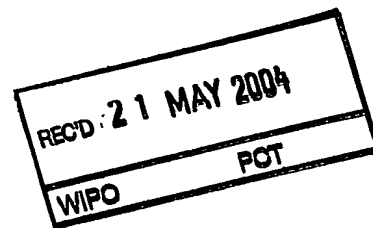
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 2 8 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 9 2 3 3 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 9 2 3 3 7]

出 願 人 学 校 法 人 日 本 大 学
Applicant(s):

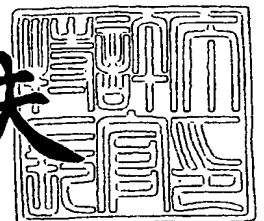


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 4 月 3 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 P-NU002
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 9/00
C12N 15/52
C12N 5/10
A01H 5/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人 日
本大学内

【氏名】 綾部 真一

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人 日
本大学内

【氏名】 明石 智義

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人 日
本大学内

【氏名】 青木 俊夫

【特許出願人】

【識別番号】 899000057

【氏名又は名称】 学校法人 日本大学

【代理人】

【識別番号】 100090941

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤野 清也

【選任した代理人】

【識別番号】 100113837

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉見 京子

【選任した代理人】

【識別番号】 100076244

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤野 清規

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014834

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】

2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチド
およびその応用

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で表わされる1-328のアミノ酸配列を実質的に有する2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ。

【請求項2】 2, 7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンあるいは2, 5, 7-トリヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンに作用してフォルモネチンあるいはジオカニンAを生成するための脱水反応を促進する請求項1記載の2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ。

【請求項3】 請求項1または2に記載の2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を実質的に有するポリヌクレオチド。

【請求項4】 配列番号2で表わされる1-1178個の塩基からなる2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチド。

【請求項5】 配列番号2に含まれるヌクレオチド配列に対して50%以上の相同性を有し、且つ2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチド。

【請求項6】 Glycyrrhiza echinata (カンゾウ) からクローニングされた請求項3～5のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項7】 配列番号2のヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの少なくとも一部にハイブリダイズするポリヌクレオチド。

【請求項8】 配列番号2の少なくとも15個の連続した配列またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドにハイブリダイズしうる、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするヌクレオチド配列または2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼのcDNAのプライマーまたはプローブとして機能しうるポリヌクレオチド。

【請求項 9】 請求項 3～6 のいずれかに記載のポリヌクレオチドでコードされる 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ。

【請求項 10】 請求項 3～6 のいずれかに記載のポリヌクレオチドがコードするたんぱく質を用い、2-ヒドロキシイソフラバノンを脱水する方法。

【請求項 11】 少なくともフラバノン、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ (IFS) と請求項 3～6 のいずれかに記載のポリヌクレオチドがコードするたんぱく質を用いてイソフラボノイドを生産する方法。

【請求項 12】 請求項 3～6 のいずれかに記載されたポリヌクレオチドが挿入されたベクター。

【請求項 13】 宿主細胞中で、請求項 3～6 のいずれかに記載されたポリヌクレオチドを発現しうる発現系を含む組換え体 DNA または RNA。

【請求項 14】 請求項 12 に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項 15】 宿主細胞が酵母である請求項 14 に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 16】 寄託番号 FERM P-19257 の組換え大腸菌細胞である請求項 14 に記載の宿主細胞。

【請求項 17】 請求項 14～16 のいずれかに記載された宿主細胞を培養することを含む 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼの製造方法。

【請求項 18】 請求項 14～16 のいずれかに記載された宿主細胞を用いるイソフラボノイドの生産方法。

【請求項 19】 請求項 3～6 のいずれかに記載されたポリヌクレオチドおよび 2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ (IFS) をコードするポリヌクレオチドで形質転換された宿主細胞を用いるイソフラボノイドの生産方法。

【請求項 20】 請求項 3～6 のいずれかに記載されたポリヌクレオチドが導入されたトランスジェニック植物。

【請求項 21】 マメ科植物である請求項 20 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 22】 請求項 20 または 21 に記載の植物を用いるイソフラボノイ

ドの生成方法。

【請求項 23】 請求項 20 または 21 に記載の植物を用いるイソフラボノイドの改変方法。

【請求項 24】 配列番号 3 で表わされる 1-319 のアミノ酸配列を実質的に有する 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ。

【請求項 25】 2, 7, 4'-トリヒドロキシイソフラバノンあるいは 2, 5, 7, 4'-テトラヒドロキシイソフラバノンに作用してダイゼインあるいはゲニステインを生成するための脱水反応を促進する請求項 24 記載の 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ。

【請求項 26】 請求項 24 または 25 に記載の 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を実質的に有するポリヌクレオチド。

【請求項 27】 配列番号 4 で表わされる 1-960 の塩基からなる 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 28】 配列番号 4 に含まれるヌクレオチド配列に対して 50% 以上の相同性を有し、且つ 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 29】 ダイズからクローニングされた請求項 26 ~ 28 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

【請求項 30】 配列番号 4 のヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドの少なくとも一部にハイブリダイズするポリヌクレオチド。

【請求項 31】 配列番号 4 の少なくとも 15 個の連続した配列またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドにハイブリダイズしうる、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするヌクレオチド配列または 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼの cDNA のプライマーまたはプローブとして機能しうるポリヌクレオチド。

【請求項 32】 請求項 26 ~ 29 のいずれかに記載のポリヌクレオチドでコードされる 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ。

【請求項 33】 請求項 26～29 のいずれかに記載のポリヌクレオチドがコードするたんぱく質を用い、2-ヒドロキシイソフラバノン脱水する方法。

【請求項 34】 少なくともフラバノン、2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ (IFS) と請求項 26～29 のいずれかに記載のポリヌクレオチドがコードするたんぱく質を用いてイソフラボノイドを生産する方法。

【請求項 35】 請求項 26～29 のいずれかに記載されたポリヌクレオチドが挿入されたベクター。

【請求項 36】 宿主細胞中で、請求項 26～29 のいずれかに記載されたポリヌクレオチドを発現しうる発現系を含む組換え体 DNA または RNA。

【請求項 37】 請求項 35 に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項 38】 宿主細胞が酵母である請求項 37 に記載の形質転換された宿主細胞。

【請求項 39】 寄託番号 FERM P-19256 の組換え大腸菌細胞である請求項 37 に記載の宿主細胞。

【請求項 40】 請求項 37～39 のいずれかに記載された宿主細胞を培養することを含む 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼの製造方法。

【請求項 41】 請求項 37～39 のいずれかに記載された宿主細胞を用いるイソフラボノイドの生産方法。

【請求項 42】 請求項 26～29 のいずれかに記載されたポリヌクレオチドおよび 2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ (IFS) をコードするポリヌクレオチドで形質転換された宿主細胞を用いるイソフラボノイドの生産方法。

【請求項 43】 請求項 26～29 のいずれかに記載されたポリヌクレオチドが導入されたトランスジェニック植物。

【請求項 44】 マメ科植物である請求項 43 に記載のトランスジェニック植物。

【請求項 45】 請求項 43 または 44 に記載の植物を用いるイソフラボノイドの生成方法。

【請求項 46】 請求項 43 または 44 に記載の植物を用いるイソフラボノイ

ドの改変方法。

【請求項 47】 カルボキシルエステラーゼのモチーフを持ち脱水反応を触媒する酵素をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 48】 カルボキシルエステラーゼのモチーフを持ち 2-ヒドロキシイソフラバノンの脱水反応を触媒する酵素をコードするポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、2-ヒドロキシイソフラバノンの脱水反応を触媒する 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ、それをコードする新規ポリヌクレオチド、及びその応用に関する。

【0002】

【従来の技術】

イソフラボンおよびイソフラボンから誘導される化合物（イソフラボノイド）は、マメ科植物特有の成分で、近年、健康補助食品として注目されている。そして、イソフラボンを含むイソフラボノイドは、抗菌物質や共生シグナルとして植物が生物環境に適応するために極めて重要な役割を果たすことが知られている。

【0003】

イソフラボノイドの最も簡単な骨格はイソフラボンであって、フラボノイド代謝によって生成されるイソフラボノイドグループのきわめて初期の産物である（図1参照）。イソフラボンとそのグリコシド（配糖体）はマメ科植物の器官に蓄積され、ダイズの種子に含まれるダイゼイン（7,4'-ジヒドロキシイソフラボン）やゲニステイン（5,7,4'-トリヒドロキシイソフラボン）の遊離体および配糖体は健康を促進し、疾病を予防するフィトエストロゲン（植物エストロゲン）として知られている。

【0004】

イソフラボンは、生態生理学的に活性のあるイソフラボノイド、たとえば、ブテロカルパンやイソフラバン骨格を有する抗菌性のフィトアレキシンが生合成される場合の中間体である。イソフラボノイドのうち約50%は4'-メトキシルに由

来する官能基を有し、これらは主として4'-メトキシ化されたイソフラボンであるフォルモノネチン(7-ヒドロキシ-4'-メトキシイソフラボン)に由来する。

【0005】

イソフラボノイド骨格は、シトクロムP450(P450)、すなわち2-ヒドロキシイソフラバノンシンターゼ(IFS)の作用によって、(2S)-フラバノンから生合成される。IFSは1,2-アリル基転位を伴うフラボノイド骨格の2位の炭素のヒドロキシル化を触媒する。生成物である2-ヒドロキシイソフラバノンは脱水されてイソフラボン形成する(図1参照)。

【0006】

IFSのcDNAは、マメ科植物であるGlycyrrhiza echinata(以下カンゾウと記載する。)(非特許文献1、特許文献1)およびダイズ(非特許文献2、非特許文献3)から同定されている。酵母のミクロソームで過剰発現させた組換えIFSを用いたインビトロ検定では、最初の生成物である2-ヒドロキシイソフラバノンに加えて、多量のイソフラボンが自発的な脱水によって生成した(非特許文献1、非特許文献3)。さらに、昆虫細胞で発現したIFSは、イソフラボンのみを生産することが報告された(非特許文献2)。このように、IFS反応の直接生成物からイソフラボン生産を非酵素的に進めることができること、およびIFSの基質である(2S)-フラバノンはマメ科および非マメ科植物の共通の成分であることから、IFSを用いてイソフラボノイドを含まない非マメ科植物を形質転換することによって、それらをイソフラボン産生植物に変換できると推測された(非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6)。

このような知見に基づき、イソフラボンを本来含有しない非マメ科植物(シロイヌナズナやタバコ)にダイズIFS遺伝子を導入して非マメ科植物によるイソフラボン生産が試みられたが、その生産量はダイズ種子の1/1000程度というわずかな量であった(非特許文献3、非特許文献7、非特許文献8)。よって、IFSのみでは、イソフラボンの生産は効率的に行われなということが推測される。

【0007】

一方、2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンをダイゼインに変換する2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼの酵素活性がPueraria lobata(クズマメ

の細胞で検出され、そのタンパク質が精製された（非特許文献9、非特許文献10）。また、本発明者らの実験によると、カンゾウの無細胞抽出物では、2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノン（フォルモノネチン）に変換されたが、2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン（ダイゼイン）に変換されなかった（非特許文献11）。これらの結果は、植物細胞での2-ヒドロキシイソフラバノンからイソフラボンへの脱水が酵素（2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ）に依存しており、酵素が置換基の異なる2-ヒドロキシイソフラバノンに対して基質特異性を有していることを示している。

【0008】

このように、従来の研究によって、IFSのみでは、イソフラボンの生産は効率的に行えないこと、2-ヒドロキシイソフラバノンからイソフラボンへの脱水には、基質特異的酵素が重要な役割をしていることが解明されてきたが、2-ヒドロキシイソフラバノンからイソフラボンへの脱水に関与する酵素（2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ）の詳細は不明であった。

【0009】

【特許文献1】

国際公開第00/46356号パンフレット

【非特許文献1】

Akashi, T., Aoki, T. and Ayabe, S. (1999) Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. *Plant Physiol.* 121: 821-828.

【非特許文献2】

Steele, C.L., Gijzen, M., Qutob, D. and Dixon, R.A. (1999) Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. *Arch. Biochem. Biophys.* 367: 146-150

【非特許文献3】

Jung, W., Yu, O., Lau, S. M., O'Keefe, D. P., Odell, J., Fader, G. and M

McGonigle, B. (2000) Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nature Biotechnol.* 18: 208-212.

【非特許文献 4】

Dixon, R.A. and Steele, C.L. (1999) Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* 4: 394-400.

【非特許文献 5】

Humphreys, J. M. and Chapple, C. (2000) Molecular 'pharming' with plant P450s. *Trends Plant Sci.* 5: 271-272.

【非特許文献 6】

Feldmann, K.A. (2001) Cytochrome P450s as genes for crop improvement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 162-167.

【非特許文献 7】

Yu, O., Jung, W., Shi, J., Croes, R.A., Fader, G.M., McGonigle, B. and O'dell, J.T. (2000) Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiol.* 124: 781-793.

【非特許文献 8】

Liu, C.J., Blount, J.W., Steele, C.L. and Dixon, R.A. (2002) Bottlenecks for metabolic engineering of isoflavone glycoconjugates in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 14578-14583.

【非特許文献 9】

Sankawa, U. and Hakamatsuka, T. (1997) Biosynthesis of isoflavone and related compounds in tissue cultures of *Pueraria lobata*. In *Dynamic aspects of natural products chemistry. Molecular biological approaches*. Edited by Ogura, K. and Sankawa, U. pp. 25-48. Kodansha/Harwood Academic, Tokyo.

【非特許文献 10】

Hakamatsuka, T., Mori, K., Ishida, S., Ebizuka, Y. and Sankawa, U. (1998) Purification of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase from the cell culture

es of *Pueraria lobata*. *Phytochemistry* 49: 497-505.

【非特許文献 11】

Akashi, T., Sawada, Y., Aoki, T. and Ayabe, S. (2000) New scheme of the biosynthesis of formononetin involving 2,7,4'-trihydroxyisoflavanone but not daidzein as the methyl acceptor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:2276-2279.

【非特許文献 12】

Akashi, T., Sawada, Y., Shimada, N., Sakurai, N., Aoki, T. and Ayabe, S. (2003) cDNA cloning and biochemical characterization of S-adenosyl-L-methionine:2,7,4'-trihydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase, a critical enzyme of the legume isoflavonoid phytoalexin pathway. *Plant Cell Physiology*. 44:103-112.

【非特許文献 13】

Ayabe, S., Akashi, T. and Aoki, T. (2002) Cloning of cDNAs encoding P450s in the flavonoid/isoflavonoid pathway from elicited leguminous cell cultures. *Methods Enzymol.* 357: 360-369.

【非特許文献 14】

Nakamura, K., Akashi, T., Aoki, T., Kawaguchi, K. and Ayabe, S. (1999). Induction of isoflavonoid and retrochalcone branches of the flavonoid pathway in cultured *Glycyrrhiza echinata* cells treated with yeast extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 1618-1620.

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、植物体においてイソフラボンを生産する工程に重要な役割を果たす脱水酵素を単離し、そのアミノ酸配列およびそれをコードするヌクレオチド配列を解明することを課題とする。より詳細には、本発明は、2-ヒドロキシイソフラバノンからイソフラボンへの脱水反応を触媒する2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼのアミノ酸構造を決定し、それをコードする遺伝子を提供することを課題とする。さらにまた、本発明は、そのようにして得られた遺伝子をイソフ

ラボンを含むイソフラボノイドの生産に応用することを課題とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決するために、本発明者らは、まず、カンゾウ（フォルモノネチン生産植物）およびダイズ（ダイゼイン生産植物）抽出物の2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼを調査し、種特異的な脱水酵素の存在を確認した。次に、生合成酵素のcDNAに関する新しい遺伝子クローニング法「機能発現分画スクリーニング」を用いて（非特許文献12）、カンゾウの2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノン2,3-デヒドラターゼ（フォルモノネチン合成酵素）をコードするcDNAを単離した。さらに、配列情報から、基質特異性の異なる相似酵素、すなわちダイズの2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン2,3-デヒドラターゼ（ダイゼイン合成酵素）のcDNAを得た。

2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードする新規な遺伝子を取得したことで、該遺伝子を非マメ科の植物に導入し、イソフラボノイドの生産量を増大できる可能性を提供できた。

また、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードする遺伝子とIFSをコードする遺伝子を同時形質転換した微生物を用いてイソフラボノイドを生産できる可能性を見出した。

さらに、本発明者らは、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼのアミノ酸配列には、カルボキシルエステラーゼで知られているモチーフが含まれていることを見出した。相似タンパク質は高等植物に広く分布しており、天然産物の生合成における脱水の一部はこの酵素ファミリーによって介在されていることを示唆している。

【0012】

すなわち、本発明は、カンゾウに含まれる2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ、特に、2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノン2,3-デヒドラターゼ（フォルモノネチン合成酵素）およびそれをコードするヌクレオチド配列に関するものである。カンゾウに含まれる2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼは、配列番号1に表わす1-328のアミノ酸配列を含んでいる。カン

ゾウの2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするcDNAの配列は、配列番号2に示した。さらに、本発明は、該新規な遺伝子を発現する組換え体、該遺伝子を組み込んだ形質転換体にも関する。形質転換体としては、酵母、E.coli（大腸菌）が好ましく、該遺伝子を導入したE.coli K12株は、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地中央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERM P-19257（寄託日平成15年3月20日）として寄託した。本発明は、さらにまた、該遺伝子あるいは該遺伝子とIFSをコードする遺伝子とを同時に組み込んだ酵母やE.coliなどの微生物あるいは植物により、イソフラボンを含むイソフラボノイドを生産する方法にも関するものである。形質転換に好ましい酵母はSaccharomyces cerevisiae BJ2168株（ニッポンジーン社）、酵母用ベクターとしては、pYES2（インビトロゲン社）、pESC-LEU（ストラタジーン社）、pESC-TRP（ストラタジーン社）、pESC-HIS（ストラタジーン社）などが挙げられる。

【0013】

本発明は、また、ダイズに含まれる2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼである、2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ（ダイゼイン合成酵素）およびそれをコードするヌクレオチド配列にも関するものである。ダイズに含まれる2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼは、カンゾウに含まれる2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼと相似しているが、カンゾウのデヒドラターゼがイソフラバノンの4'-メトキシ体を基質とするのに対して、4'-ヒドロキシ体を基質とするものであって、配列番号3に表わす1-319のアミノ酸配列を含んでいる。ダイズの2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするcDNAの配列は、配列番号4に示した。さらに、本発明は、該新規な遺伝子を発現する組換え体、該遺伝子を組み込んだ形質転換体にも関するもので、酵母、E.coli（大腸菌）が好ましく、該遺伝子を導入したE.coli K12株は、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地中央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに受託番号FERM P-19256（寄託日平成15年3月20日）として寄託した。本発明は、さらにまた、該遺伝子あるいは該遺伝子とIFSをコードする遺伝子とを同時に組み込んだ酵母やE.coliなどの微生物

物あるいは植物により、イソフラボンを含むイソフラボノイドを生産する方法にも関するものである。形質転換に好ましい酵母は Saccharomyces cerevisiae BJ 2168株 (ニッポンジーン社)、酵母用ベクターとしては、pYES2 (インビトロゲン社)、pESC-LEU (ストラタジーン社)、pESC-TRP (ストラタジーン社)、pESC-HIS (ストラタジーン社) などが挙げられる。

【0014】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を具体的に説明する。

本発明において、カンゾウの2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼたんぱく質をHIDM、それをコードする遺伝子をHIDM、ダイズの2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼたんぱく質をHIDH、それをコードする遺伝子をHIDHと記することができる。

【0015】

本発明は、配列番号1あるいは3で表わされるアミノ酸配列を実質的に有する2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼに関するが、本発明で、「アミノ酸配列を実質的に有する」とは、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ活性を有する限り、当該アミノ酸配列に欠失、置換、付加、挿入等の変異があるものを含むことを意味する。欠失、置換、付加、挿入されるアミノ酸の数は、例えば、1~20個、好ましくは1~10個、特に1~5個であり得る。特に、アミノ酸残基を同様の特性のアミノ酸残基で置換したものであり、典型的なかかる置換は、Ala、Val、LeuおよびIle間、SerおよびThr間、AspおよびGlu間、AsnおよびGln間、LysおよびArg間、PheおよびTyr間の置換である。

【0016】

さらに、本発明は、配列番号2あるいは4で表わされるヌクレオチド配列または該ヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を実質的に有するポリヌクレオチドに関するが、本発明で、「ヌクレオチド配列を実質的に有する」とは、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードする配列からなるポリヌクレオチドのほか、該配列と縮重による配列の相違、5'末端あるいは3'末端又はその両末端に適当な配列が付加されたポリヌクレオチドを含む意味である。

【0017】

【実施例】

以下に、実施例によって、本発明を詳細に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。

＜材料と方法＞

本発明において用いた材料と手法は次のとおりである。

(1) 化学物質

ダイゼイン、ゲニステイン、ビオカニンAは、エクストラシンテース社から、(RS)-ナリンゲニンおよびp-ニトロフェニル酪酸はシグマ社から得た。フォルモノネチンは本発明者らの研究室のストックから入手した。

2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン（非特許文献13）および2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノン（非特許文献12）は次のように調製した。すなわち、2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンは、CYP93C2（IFS）を発現する酵母ミクロソーム、リクイリチゲニン（Liquiritigenin）、NADPHをインキュベートして、酢酸エチルで抽出、シリカゲルTLCで分離し、さらに逆相HPLCで精製して調製した。2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンは、S-アデノシル-L-メチオニン（SAM）、2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン、組み換え2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン4'-O-メチルトランスフェラーゼ（HI 4' OMT）の反応混合物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルTLCで分離、さらにHPLCで精製して調製した。

2,5,7,4'-テトラヒドロキシイソフラバノンは、CYP93C2を発現する酵母のミクロソーム（非特許文献1）と（RS）-ナリンゲニンおよびNADPHとのインキュベーションによって調製した。生成物（Rf 0.30）は、シリカゲル薄層クロマトグラフィ（TLC）[Kieselgel F254（メルク社）；溶媒はトルエン：酢酸エチル：メタノール：石油エーテル＝6：4：1：3]によって精製した。

【0018】

(2) 植物材料

カンゾウの培養細胞（Ak-1系）は文献（非特許文献1）に従って、カンゾウの葉及び葉柄から作製した。 α -ナフトレン酢酸（1 μ g/ml）及びN6-ベンジルア

デニン ($1\mu\text{g/ml}$) を含有する1/2濃度のMurashige-Skoog培地 (0.3% (w/v) ジェランガムで固化) 中、12時間光照射 (6,000ルクス) /12時間暗所サイクルで培養し、エリシター処理した細胞より cDNAライブラリーを構築した。懸濁培養物は2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 ($0.1\mu\text{g/ml}$) とカイネチン ($0.1\mu\text{g/ml}$) を添加Murashige-Skoog培地中、暗所で維持した。エリシター処理は0.2% (w/v培養液) の酵母抽出物 (インビトロゲン社) を使用して行った (非特許文献14)。

ダイズの種子 (*Glycine max* L. 中生枝豆: トーホク社) は、水に24時間浸漬し、コニカルビーカー内の濾紙の上に撒いた。ダイズの実生は、明12時間/暗12時間という条件で室温で1週間成長させた。

【0019】

(3) 無細胞抽出物の調製

操作はすべて4℃で行った。エリシター処理 (24時間) 後のカンゾウ細胞 (10 g) あるいは1週齢のダイズの実生 (10 g) は、10%スクロースおよび14 mM 2-メルカプトエタノールを含む100 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 10 mlおよび海砂 (2.5 g) を用いて乳鉢でホモジェナイズした。ホモジェネートはガーゼで濾過し、10,000gで10分間遠心分離した。上清を2.5gのDowex 1-X2 (100 mMリン酸カリウム緩衝液で平衡化、pH 7.5) と混合し、20分間放置した。濾過によって得られた溶液は、硫酸アンモニウムを用いて分画し、30%~80%飽和画分をSephadex G-25カラムで脱塩し、10%スクロースおよび14 mM 2-メルカプトエタノールを含む100 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解しアッセイに用いた (約 $600\mu\text{g}$ タンパク質/ml)。

【0020】

(4) 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼのアッセイ

2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン、2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンまたは2,5,7,4'-テトラヒドロキシイソフラバノン (各5 nmol) を含む2-メトキシエタノールに酵素調製液を加え (総容量: $100\mu\text{l}$)、30℃で10分間インキュベートした。

2,5,7-トリヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンデヒドラターゼ (ビオカニンA合成酵素) のアッセイは以下のように行った。2-メトキシエタノールに溶解

した2,5,7,4'-テトラヒドロキシイソフラバノン (10 nmol) を、カンゾウHI4'OM T (1 μ g)、1 μ mol S-アデノシル-L-メチオニン (SAM) とともに30℃で15分間インキュベートした。

濃縮した酢酸エチル抽出物を組換えカンゾウ HIDM (1 μ g) と30℃で10分間インキュベートした。混合物の酢酸エチル抽出物を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。ダイゼインおよびフォルモノネチン分析のHPLCは、Capcell pak C18 MG カラム (4.6×150mm; 資生堂社) を用いて40℃ (流量0.8ml/min) で行った (非特許文献12)。溶出溶媒はメタノールと3%酢酸水を用いた。40分の間に35%~55%になるように直線グラジエントで溶出させた。5-ヒドロキシイソフラボンは、Capcell pak C18 MGカラム (4.6×150 mm; 資生堂社) を用いて50%メタノール水溶液 (ゲニステインの場合) または55%メタノール水溶液 (ビオカニンAの場合) によって40℃ (流量0.8 ml/分) で分析した。

精製した組換えタンパク質 (約10 ngタンパク質) とカンゾウおよびダイズ (約10 μ gタンパク質) の無細胞抽出物を用いて比活性を測定した。イソフラボン濃度は、ダイゼイン、フォルモノネチン、ゲニステインの標準試料のHPLCピーク面積から算出した。

【0021】

(5) カンゾウ細胞の2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするcDNA (HIDM) のクローニング

タンパク質の発現および大腸菌の粗抽出物の調製は既報のように行った (非特許文献12)。

酵母抽出物でエリシター処理 (6時間および12時間) したカンゾウ細胞から構築したcDNA発現ライブラリー (非特許文献12) をスクリーニングに使用した。カンゾウ λ ZapII cDNAライブラリーを Exassist ヘルパーファージ (ストラタジーン社) と E.coli DH5 α F' IQ (インビトロゲン社) を用いてin vivo excisionによりファージミドに変換した。

ファージミドはDH5 α F' IQに導入され、E.coli細胞は、Luria-Bertani (LB)/アンピシリン (50 μ g/ml) 寒天プレート上で増殖した。母プレートからLB/アンピシリン培養液中に約30,000の大腸菌 (E. coli) 形質転換体をそれぞれ含む5

つの独立したcDNA分画プールを調製した。5mMIPTGを含むLB液体培地で培養し、細胞を回収後、粗酵素液を調製した。

2-メトキシエタノール2 μ lに溶解した2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン (0.4 nmol) に組換えカンゾウ HI4'OMT (50 ng) を加え (非特許文献12)、0.4 nmol S-アデノシル-L-[メチル- 14 C]メチオニン ([14 C]SAM、2.26 GBq/mmol、アマシャム バイオサイエンス社) の存在下で30℃で3分間プレインキュベートした (総容量: 50 μ l)。次に、大腸菌プールの粗抽出物 (100 μ l) を混合物に加え、30℃でさらに10分間インキュベートした。酢酸エチルを加えて反応を停止させた後、混合物の酢酸エチル抽出物をシリカゲルTLC [LK6DF (ワットマン社)] ; 溶媒はクロロホルム:アセトン:25%アンモニア水=70:29:1; 2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノン (Rf 0.15)、フォルモノネチン (Rf 0.30)] で展開し、画像分析装置 (Typhoon 8600、アマシャム バイオサイエンス社) によって分析した。 [14 C]フォルモノネチンを生成した陽性プールを次のスクリーニングのために選択し、小さいサイズ (約3,000クローン/プール) の10プールに分画した。陽性プールの分画と検定は4回繰り返し、2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンデヒドラターゼ活性を示すクローン (HIDM) を単離した。 (図2参照)

プラスミドを回収し、オートシーケンサー (LIC-4000, アロカ社) を用いてヌクレオチド配列を決定した。

【0022】

(6) HIDMと相同のダイズcDNA (HIDH) のクローニング

ポリ (A) + RNAをRNeasy Plant Mini Kit (キアゲン社) を用いてダイズの実生から単離し、cDNAをReady-To-Go T-Primed First Strand Kit (アマシャム バイオサイエンス社) を用いて合成した。NdeIまたはBamHI部位 (下線で示す) を含む2つのPCR特異プライマーは、開始コドンおよび終止コドン配列を指定するダイズESTのTC98460のコード領域から設計した (TC98-Fow、GTCATATGGCGAAGGAGATAGTGAA (配列番号5); TC98-Rev、AGGGATCCATCAAACCAGAAAAGA (配列番号6))。プライマーおよび鋳型としてダイズcDNAを用いた逆転写 (RT) -PCRによって得られたcDNA (HIDH) は、pT7Blue T-ベクター (ノバゲン社) に組み込み、ヌク

レオチド配列を決定した。

【0023】

(7) 大腸菌におけるカンゾウ HIDMおよびダイズHIDHの異種発現

NdeIまたはBamHI部位（下線で示す）を含む2つのプライマーは、カンゾウ HIDMのコード領域から設計した（GeDchy-F、GTCATATGGCTTCTTCAACCTCAAC（配列番号7）；GeDehy-R、CTGGATCCTCAAACAAGGAAGGAAG（配列番号8））。カンゾウ HIDMから得られたPCR生成物のNdeI-BamHIフラグメントは、pET28a（ノバゲン社）の対応する部位にクローニングした。さらに、クローニングしたダイズcDNA（HIDH）のNdeI-BamHIフラグメントは、pET28aの対応する部位にもサブクローニングした。遺伝子組換え2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼの発現および精製は、次の方法で行った（非特許文献12）。各ベクターと一緒に形質転換された E. coli BL21(DE3)細胞は30℃で20mlの50 μg/mlカナマイシンあるいはアンピシリン添加のLB/アンピシリン培地中でOD600=0.4まで培養された。IPTGが最終濃度1.0mMになるように添加され、6時間30℃でインキュベートされた。カンゾウ HIDMおよびダイズHIDHは、HisTrap Kit（アマシャム バイオサイエンス社）を用いてHIDMおよびHIDH発現E. coliの粗抽出物から精製された。

【0024】

(8) カルボキシルエステラーゼ活性の測定

組換えカンゾウ HTDMおよびダイズHIDHタンパク質の特異的カルボキシルエステラーゼ活性は、150 mM NaClおよび750 nmol p-ニトロフェニル酪酸を含む50 mM Tris-HCl緩衝液（pH 9.0）1.5 ml中における吸光度400 nmで30℃で測定したp-ニトロフェノールの生成速度から算出した（Heymann 1981）。市販のブタ肝臓カルボキシルエステラーゼ（シグマ社）を陽性対照として用いた。熱変性（100℃、10分間）させたカンゾウ HIDM、ダイズHIDH、ブタ肝臓カルボキシルエステラーゼタンパク質を陰性対照として分析した。

【0025】

(9) RT-PCR分析

懸濁培養したカンゾウ細胞は、酵母抽出物で処理し、3、6、12、24、48時間後に収集した（非特許文献1）。mRNAはStraight A's mRNA単離システム（ノバゲ

ン社)を用いて抽出し、cDNAを合成した。RT-PCRには、カンゾウ HIDM、IFS (非特許文献 12)、HI4'OMT (非特許文献 12) から設計した特異プライマーを使用した。反応は94℃で1分間の変性によって開始し、3工程のインキュベーション(94℃、1分間; 55℃、1分間; 72℃、1分間)を30サイクル繰り返した。生成物は、1.2% (w/v) アガロースゲルの電気泳動にかけ、臭化エチジウムで染色した。

【0026】

上記の材料および方法によって得られた本発明の結果を示す。

(1) カンゾウ細胞およびダイズの実生における2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ活性

カンゾウ細胞はエリシター処理後にメディカルピン (4'-メトキシイソフラボノイド、図1参照) を蓄積するが、4'-ヒドロキシイソフラボノイドは蓄積しない (Nakamura et al. 1999)。ダイズはイソフラボンの、ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン配糖体を産生することが知られており、それらはいずれも4'-ヒドロキシル化体である (Dewick 1986, Dewick 1993, Aussenac 1998)。したがって、カンゾウ細胞およびダイズの実生の抽出物には、それぞれ適切に置換された2-ヒドロキシイソフラバノンからフォルモノネチンおよびダイゼインを生成する活性が存在すると推測される。HPLCを用いて活性を調べた結果を表1に示す。

【表1】

カンゾウHIDMとダイズHIDHの比活性

基 質	生成物	比活性 (a),(b)				
		カンゾウ		ダイズ		
		粗抽出物 (c) (pkatal/mg)	組換えたんぱく質 (d) (nkatal/mg)	粗抽出物 (c) (pkatal/mg)	組換えたんぱく質 (d) (nkatal/mg)	ブタ肝臓カルボキシルエステラーゼ (nkatal/mg)
2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノン	フォルモノネチン	123.0±8	52.1±1.5	97.4±10	0.90±0.1	—(e)
2,5,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン	ケニステイン	—(e)	—(e)	19.6±3	3.55±0.6	—(e)
2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン	タイセイン	0.8±0.03	0.70±0.08	197.3±15	43.6±4	0
p-ニトロフェニル酪酸	p-ニトロフェニル	—(e)	0.32±0.07 (f)	—(e)	7.20±0.4 (f)	425±7 (f)

(a) 平均±SD(3実験)

(b) 比活性はイソフラボンとp-ニトロフェニル生成物の生成量から計算した

(c) 0.2%酵母抽出物で24時間エリシター処理したカンゾウ細胞(Ak-1系)あるいはダイズ実生の無細胞抽出物の硫酸アンモニウム(30%~80%飽和)沈殿物

(d) 精製組換えたんぱく質

(e) 未解析

(f) 熱処理(100°C、10分)されたたんぱく質とp-ニトロフェニル酪酸とのアッセイでは、酵素的脱水活性を示さなかった

表1から分かるとおり、2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンをカンゾウの無細胞抽出物とインキュベートした場合では、フォルモノネチンが生成した。カンゾウ抽出物による2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンからのダイゼ

インの生成も少量認められたが、その活性はフォルモノネチンの生成より約160倍低かった。

ダイズ実生の無細胞抽出物では、2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノン（フォルモノネチンを産生）および2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン（ダイゼインを産生）からほぼ1:2のフォルモノネチンとダイゼインの生成が検出された。さらに、ダイズ抽出物は、ダイゼインの生成の約1/10のレベルで、2,5,7,4'-テトラヒドロキシイソフラバノンからのゲニステインの生成を触媒した。

一方、2-ヒドロキシイソフラバノンの自発的な脱水は、中性緩衝液（pH 7.5）における50 μ Mの基質濃度による実験条件では無視し得るものであった。これらの結果は、植物細胞でイソフラボン形成する2-ヒドロキシイソフラバノンの脱水は酵素触媒反応であることを強く示唆している。さらに、カンゾウおよびダイズの2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼの基質特異性は異なることが推定される。

【0027】

(2) 機能発現分画スクリーニングによるカンゾウの2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼcDNAの取得

2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンからフォルモノネチンへの変換の特異的かつ高感度の検出は、酵母の遺伝子組換えIFSによって調製した精製2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン（非特許文献1）、 $[^{14}\text{C}]$ SAMおよびアフィニティ精製したN末端に6個のヒスチジンを含む組換えカンゾウHI4'OMT（非特許文献12）を組み合わせ用い、検定前に $[^{14}\text{C}]$ -2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンを産生することによって可能になった。酵母抽出物で処理したカンゾウ細胞のcDNA発現ライブラリー（非特許文献12）を用いてデヒドラターゼのcDNAのスクリーニングを行った。最初のスクリーニングは、5つのcDNAプール（形質変換体30,000/プール）で実施した。大腸菌プールの抽出物は、 $[^{14}\text{C}]$ -2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンを産生させた上記の混合物と反応させ、反応混合物の酢酸エチル抽出物をTLCオートラジオグラフィーによって分析した。2つのプールが $[^{14}\text{C}]$ フォルモノネチンを産生することが判明し、任意に選択

した陽性プールの一方を小さいサイズ（約3,000クローン/プール）の10プールに分画した。タンパク質の発現および分析を再び行い、10プールのうちの1つの陽性プールを同定した。陽性プールの分画および分析を繰り返した。10プールのうちの1つの陽性プールを、3回目（約300クローン/プール）、4回目（30クローン/プール）および5回目（3クローン/プール）のスクリーニングで繰り返し同定した。最後に、2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンデヒドラターゼ活性を示す単一の大腸菌クローンを単離した（図2参照）。

酵素をコードするcDNAを回収し、シーケンサーを用いて配列決定を行った。HIDM (2-hydroxyisoflavanone dehydratase methoxy type) のcDNAは1,178 bpのヌクレオチドを有し、328のアミノ酸をコードしていた（図3A）。タンパク質-タンパク質BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 検索では、カンゾウのHIDMの推定アミノ酸配列はArabidopsis thaliana（シロイヌナズナ）の推定タンパク質と40%の同一性（受入れ番号At1g47480、AT3g48690、At3g48690）、Nicotiana tabacum（タバコ） hsr203Jと34%の同一性（受入れ番号X77136）（Pontier et al 1994）、エンドウマメE86と31%の同一性（受入れ番号AB026296）（Ichinose et al. 2001）、Archaeoglobus fulgidus（好熱性硫黄細菌）のカルボキシルエステラーゼと32%の同一性（受入れ番号1JJIA）（Manco et al. 2000）を示すことが明らかになった。また、カンゾウ HIDMはカルボキシルエステラーゼで記録された保存配列のモチーフを有していた（N末端から約40～180アミノ酸）。リパーゼおよびエステラーゼとともにオキシアニオンホールを形成する保存配列（His 85-Gly 86-Gly 87：図3Aにおいて枠で囲んだ配列）は、カルボキシルエステラーゼのモチーフに存在していた（Contreras et al,1996, Laurell et al. 2000, Hosokawa 2002）。カンゾウHIDMタンパク質では、一般的なりパーゼおよびエステラーゼの触媒トライアドに保存されたSer残基（Osterlund et al 1996, Contreras et al. 1996, Manco et al. 2000, Hosokawa 2002）がThr残基に置換されているものの、仮想の触媒トライアド（Thr 173、Asp 272およびHis 304）がカルボキシルエステラーゼモチーフの外側に認められた。図3Aにおいて、仮想の触媒トライアド（Thr 173、Asp 272およびHis 304）には※を付した。

【0028】

(3) マメ科植物ライブラリーにおけるカンゾウデヒドラターゼの相同cDNAの検索

ダイズ(<http://www.tigr.org/tdb/tgi/gmgi/>)、Medicago truncatula (タルウマゴヤシ) (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/mtgi/>)、Lotus japonicus (ミヤコグサ) (<http://www.kazusa.or.jp/cn/plant/lotus/EST/>) (Asamizu et al. 2000) のエクスプレスドシーケンスタグ (EST) データベースの検索から、これらの植物にカンゾウ HIDM と相同 (アミノ酸同一性>50%) のcDNAが存在することが明らかになった。しかし、これらの配列はすべて仮想タンパク質としてのみ注釈が付けられていた。分子系統樹では、ダイズBM177194、L. japonicus TC3332、M. truncatula TC43540タンパク質が、カンゾウのデヒドラターゼと同じ分枝を形成 (アミノ酸レベルでの同一性>80%) することが示された (図3B)。ダイズTC98460タンパク質は4種類のタンパク質と>60%の同一性を有し、M. truncatula B G456496と密接な分枝を形成した (図3B)。

【0029】

(4) カンゾウとダイズの遺伝子組換え2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼの特性決定

ダイズのEST配列TC98460は、予測された開始コドンおよび終止コドンを有している。cDNAのコード領域をダイズ実生からRT-PCRでクローニングし、HIDH (2-hydroxyisoflavanone dehydratase hydroxy type) と命名した。

カンゾウ HIDM およびダイズ HIDH は大腸菌で発現させ、N末端に6つのヒスチジン残基を持つ組換えタンパク質を精製し、2-ヒドロキシイソフラバノンに対する活性を測定した。図4Aに示すように、カンゾウ HIDM と2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンとのインキュベーションによってフォルモノネチンが生成された。生成物 (フォルモノネチン) の同定は標準サンプルとのRt値の比較および電子衝撃質量分析法 (m/z 268の分子イオンピーク、 m/z 132のretro-Diels-Alderフラグメントピーク) によって確認した。さらに、カンゾウ HIDM によって2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンから少量のダイゼインが産生された。カンゾウ HIDM の2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンに対する比活性は2,7

,4'-トリヒドロキシイソフラバノンに対するものより74倍高く、組換えタンパク質の生化学的特性がカンゾウ無細胞抽出物のものと一致することを示している(表1)。

組換えダイズHIDHを、2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンと2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンを用いてアッセイするとHPLC上で、ダイゼインとフォルモノネチンのピークが現われることを確認した(図4A)。イソフラボンの化学構造は電子衝撃質量分析法によって再確認した。さらに、ダイズHIDHは、2,5,7,4'-テトラヒドロキシイソフラバノンからのゲニステインの生成を触媒した(図4A)。表1に示すように、HIDHの比活性は2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンに対して最も高かったが、別の4'-ヒドロキシル化された基質に対しては比較的低く(約1/10)、4'-メトキシ基を持つ基質に対してはきわめて低かった。

さらに、カンゾウ HI4'OMTと2,5,7,4'-テトラヒドロキシイソフラバノンおよびSAMとのインキュベーションによって得られた2,5,7-トリヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンと予想される化合物をカンゾウ HIDMとインキュベートした場合には、HPLCでビオカニンAが検出された(図4B)。

【0030】

(5) 遺伝子組換えカンゾウおよびダイズの2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼのカルボキシルエステラーゼ活性

p-ニトロフェニル酪酸は、カルボキシルエステラーゼアッセイで一般に用いられる基質である。遺伝子組換えカンゾウおよびダイズのデヒドラターゼはp-ニトロフェニル酪酸に弱い活性を示した(表1)。これに対して、ブタ肝臓カルボキシルエステラーゼは2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンを脱水しなかった(表1)。

【0031】

(6) カンゾウ細胞のフォルモノネチン経路における遺伝子発現

RT-PCR分析から、カンゾウ細胞のHIDM、HI4'OMTおよびIFSの転写レベルは酵母抽出物による処理から6~12時間後に増加することが明らかになった(図5)。

【0032】

以上の結果から、次のことが明らかになった。

本発明では、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするcDNA、カンゾウ HIDM、ダイズHIDHをクローニングした。HIDMおよびHIDHは4'-メトキシルおよび4'-ヒドロキシル置換基を有する2-ヒドロキシイソフラバノンに対して異なった基質特異性を示す。これらの酵素は、命名法に各酵素の最も好ましい基質を用いて、カンゾウの2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノン-2,3-デヒドラターゼ（フォルモノネチン合成酵素）およびダイズの2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノン-2,3-デヒドラターゼ（ダイゼイン合成酵素）と呼ぶことができる。重要なことは、基質特異性は各植物種に含まれるイソフラボンの構造（さらには生合成経路の下流のイソフラボノイド）を反映していることである。したがって、植物細胞の2-ヒドロキシイソフラバノンからのイソフラボンの生成は酵素に依存している可能性が非常に高い。

【0033】

遺伝子組換えカンゾウ HIDMタンパク質による2-ヒドロキシイソフラバノン脱水酵素反応の比活性は、カンゾウの粗抽出物よりも約400～900倍高く、遺伝子組換えタンパク質および粗抽出物はいずれも2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンよりも2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンに対して極めて高い選択性を示した。これは、粗抽出物の主要な活性がHIDMタンパク質にあることを強く示唆している。さらに、誘導したカンゾウ細胞のHIDM mRNAがIFSとHI4' OMTのmRNAと同等に蓄積することは、HIDMがフォルモノネチンの生合成に関与していることを示唆している。

一方、ダイズ抽出物は2,7-ジヒドロキシ-4'-メトキシイソフラバノンおよび2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンに対する脱水活性を約1:2の割合で触媒した。これに対して、遺伝子組換えダイズHIDHタンパク質の活性は2-ヒドロキシイソフラバノンの4'-ヒドロキシル化体にきわめて特異的であった。これらのことから、ダイズの4'-ヒドロキシル化イソフラボンの生成はHIDHに起因している可能性が高い。

【0034】

本発明で、さらに興味深い所見は、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラター

ぜは加水分解酵素ファミリーのカルボキシルエステラーゼに分類される配列を有するタンパク質であるということである。実際に、ダイズHIDHはp-ニトロフェニル酪酸に対して弱いカルボキシルエステラーゼ活性を有していた（ブタ肝臓酵素の約1/50）。本発明は、このファミリーのタンパク質が脱水を触媒することを最初に実証したものである。

【0035】

P. lobata（クズマメ）で報告された2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼの特性はダイズHIDHの特性と一致する（Hakamatsuka et al. 1998）。P. lobataのタンパク質の分子量（38 kDa）はダイズHIDHの計算値（35,115）に近い。さらに、2,7,4'-トリヒドロキシイソフラバノンに対するP. lobataのデヒドラターゼの比活性（56.8 mkatal/kgタンパク質）は、遺伝子組換えダイズHIDHの活性（43.6 mkatal/mg）とほぼ同様である。非常に興味深いことに、P. lobataのタンパク質のHis残基は活性に重要であることが報告されており（Hakamatsuka et al. 1998）、Hisはカルボキシルエステラーゼの触媒トライアードのアミノ酸の1つである（Satoh and Hosokawa 1995, Wei et al. 1999）。したがって、P. lobataの2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼはカルボキシルエステラーゼファミリーのタンパク質でもあったと考えられる。

【0036】

いくつかのデヒドラターゼ遺伝子/タンパク質は、数種類の植物から特性が決定されている。これらにはデヒドロキナ酸デヒドラターゼ（Deka et al. 1994）、 δ -アミノレブリン酸デヒドラターゼ（Kaczor et al. 1994）、イミダゾールグリセロールリン酸デヒドラターゼ（Tada et al. 1994）、アレンオキシド合成酵素（Song et al. 1993）が含まれる。しかし、これらのデヒドラターゼとHIDM/HIDHとの間ではヌクレオチドおよびアミノ酸配列の有意な相同性は認められていない。

【0037】

HIDM/HIDHとある程度相同のカルボキシルエステラーゼモチーフを有するタンパク質は植物界に広く分布している。さらに、植物性天然産物の生合成では酵素の特性が決定されていない多くの脱水反応があり、たとえばプテロカルパン骨格

を生じる2'-ヒドロキシイソフラバン-4-オールの脱水環化がある (Bless and Barz 1988, Guo et al. 1994a, Guo et al. 1994b)。ヒヨコマメおよびダイズのそれぞれのイソフラボノイドの生合成では各植物のミクロソームの実験から、メチレンジオキシ環の生成およびフェノール環のプレニル置換基の環化はP450によるものである (Clemens and Barz 1996, Welle and Grisebach 1988)。しかし、P450とともにデヒドラターゼがこれらの反応に関与している可能性もあり、その酵素タンパク質はカルボキシルエステラーゼファミリーに分類されるかもしれない。また、触媒機能が未同定のこの種のタンパク質をコードするいくつかの植物遺伝子が病原体に反応して誘導されることが報告されている (Pontier et al. 1994, Walden et al. 1999, Ichinose et al. 2001, Tronchet et al. 2001, Bezier et al. 2002)。これらは、防御に関わる化合物の生合成に関与するデヒドラターゼであることも考えられる。

【0038】

2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ遺伝子の同定は、マメ科および非マメ科植物の代謝エンジニアリングにきわめて重要である。これまでのところ、非マメ科植物でイソフラボノイドを生成するために、ダイズIFSを過剰発現する形質転換型 *Arabidopsis thaliana* および *Nicotiana tabacum* が構築されているが (非特許文献3、非特許文献7、非特許文献3)、形質転換体のイソフラボノイドの生産性は満足できるものではない。典型的な場合では、シロイヌナズナの生重量1 gあたり約2 ng~4 ngのゲニステインが生産されるのに対して (非特許文献7、非特許文献8)、ダイズ種子の乾重量1 gあたり約4 mg~10 mg相当のイソフラボン (Aussenac et al. 1998) およびルーピン実生の生重量1 gあたり約3 mgのイソフラボンが生産される (Katagiri et al. 2000)。フラバノンから2-ヒドロキシイソフラバノンへの代謝フローと3-ヒドロキシフラバノンに至る別のフローとの競合は、形質転換型シロイヌナズナにおけるイソフラボン生産のボトルネックになると思われ、実際にIFSで形質変換したシロイヌナズナのフラバノン3-ヒドロキシル化酵素変異体におけるイソフラボン生産は6~31倍に増加している (Liu et al. 2002)。非マメ科植物でIFSとHIDHを同時に発現させることにより、イソフラボン生産量が増大する可能性がある。

さらに、HIDHおよびHIDMを導入遺伝子に用いた遺伝子工学によって、マメ科植物のイソフラボノイド経路を修正することも実現可能である。

また酵母などでのイソフラボノイド生産も期待できる。

References

Akashi, T., Aoki, T. and Ayabe, S. (1999) Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. *Plant Physiol.* 121: 821-828.

Akashi, T., Sawada, Y., Aoki, T. and Ayabe, S. (2000) New scheme of the biosynthesis of formononetin involving 2,7,4'-trihydroxyisoflavanone but not daidzein as the methyl acceptor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 2276-2279.

Akashi, T., Sawada, Y., Shimada, N., Sakurai, N., Aoki, T. and Ayabe, S. (2003) cDNA cloning and biochemical characterization of S-adenosyl-L-methionine: 2,7,4'-trihydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase, a critical enzyme of the legume isoflavonoid phytoalexin pathway. *Plant Cell Physiology.* 44: 103-112.

Aoki, T., Akashi, T. and Ayabe, S. (2000) Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. *J. Plant Res.* 113: 475-488.

Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S. and Tabata, S. (2000) Generation of 7137 non-redundant expressed sequence tags from a legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res.* 7: 127-130.

Aussenac, T., Lacombe, S. and Dayde, J. (1998) Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: effects of variety and environment. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 1480S-1485S.

Ayabe, S., Akashi, T. and Aoki, T. (2002) Cloning of cDNAs encoding P450s in the flavonoid/isoflavonoid pathway from elicited leguminous cell cultures. *Methods Enzymol.* 357: 360-369.

Basarab, G. S., Steffens, J.J., Wawrzak, Z., Schwartz, R.S., Lundqvist, T. and Jordan, D.B. (1999) Catalytic mechanism of scytalone dehydratase: site-directed mutagenesis, kinetic isotope effects, and alternate substrates. *Biochemistry* 38: 6012-6024.

Baudouin, E., Charpentreau, M., Roby, D., Marco, Y., Ranjeva, R. and Rantay, B. (1997) Functional expression of a tobacco gene related to the serine hydrolase family -- esterase activity towards short-chain dinitrophenyl acylesters. *Eur. J. Biochem.* 248: 700-706.

Bezier, A., Lambert, B. and Baillieul, F. (2002) Cloning of a grapevine Botrytis-responsive gene that has homology to the tobacco hypersensitivity-related hsr203J. *J. Exp. Bot.* 53: 2279-2280.

Bless, W. Barz, W. (1988) Isolation of pterocarpan synthase, the terminal enzyme of pterocarpan phytoalexin biosynthesis in cell suspension cultures of *Cicer arietinum*. *FEBS Lett.* 235: 47-50.

Clemens, S. and Barz, W. (1996) Cytochrome P450-dependent methylenedioxy bridge formation in *Cicer arietinum*. *Phytochemistry* 41: 457-460.

Contreras, J.A., Karlsson, M., Osterlund, T., Laurell, H., Svensson, A. and Holm, C. (1996) Hormone-sensitive lipase is structurally related to acetylcholinesterase, bile salt-stimulated lipase, and several fungal lipases. Building of a three-dimensional model for the catalytic domain of hormone-sensitive lipase. *J. Biol. Chem.* 271: 31426-31430.

Deka, R.K., Anton, I.A., Dunbar, B. and Coggins, J.R. (1994) The characterisation of the shikimate pathway enzyme dehydroquinase from *Pisum sativum*. *FEBS Lett.* 349: 397-402.

Dewick, P.M. (1986) Isoflavonoids. In *The Flavonoids. Advances in Research since 1980*, Edited by Harborne, J.B. pp. 125-209, Chapman and Hall, London.

Dewick, P.M. (1993) Isoflavonoids. In *The Flavonoids. Advances in Research since 1986* Edited by Harborne, J.B. pp. 117-238, Chapman and Hall, London.

Dixon, R.A. (2002) Genistein. *Phytochemistry* 60: 205-211.

Dixon, R.A. (1999) Isoflavonoids: biochemistry, molecular biology, and biological functions. In *Comprehensive Natural Products Chemistry. Volume 1. Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives*. Edited by Sankawa, U. pp. 773-823. Elsevier, Amsterdam.

Dixon, R.A. and Steele, C.L. (1999) Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* 4: 394-400.

Feldmann, K.A. (2001) Cytochrome P450s as genes for crop improvement. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 162-167.

Guo, L., Dixon, R.A. and Paiva, N.L. (1994a) Conversion of vestitone to medicarpin in alfalfa (*Medicago sativa* L.) is catalyzed by two independent enzymes. Identification, purification, and characterization of vestitone reductase and 7,2'-dihydroxy-4'-methoxyisoflavanol dehydratase. *J. Biol. Chem.* 269: 22372-22378.

Guo, L., Dixon, R.A., and Paiva, N.L. (1994b). The 'pterocarpan synthase' of alfalfa: association and co-induction of vestitone reductase and 7,2'-dihydroxy-4'-methoxy-isoflavanol (DMI) dehydratase, the two final enzymes in medicarpin biosynthesis. *FEBS Lett.* 356: 221-225.

Hakamatsuka, T., Mori, K., Ishida, S., Ebizuka, Y. and Sankawa, U. (1998) Purification of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase from the cell cultures of *Pueraria lobata*. *Phytochemistry* 49: 497-505.

Hashim, M.F., Hakamatsuka, T., Ebizuka, Y. and Sankawa, U. (1990) Reaction mechanism of oxidative rearrangement of flavanone in isoflavone biosynthesis. *FEBS Lett.* 271: 219-222.

Heymann, E. and Mentlein, R. (1981) Carboxylesterases-amidases. *Methods Enzymol.* 77: 333-344.

Hosokawa, M. (2002) Multiplicity and regulatory mechanism of carboxylesterase isozymes which catalyzes the hydrolysis of long-chain fatty acid esters. *Seikagaku* 74: 311-316.

Humphreys, J. M. and Chapple, C. (2000) Molecular 'pharming' with plant P450s. Trends Plant Sci. 5: 271-272.

Ichinose, Y., Hisayasu, Y., Sanematsu, S., Ishiga, Y., Seki, H., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Yamada, T. (2001) Molecular cloning and functional analysis of pea cDNA E86 encoding homologous protein to hypersensitivity-related hsr203J. Plant Sci. 160: 997-1006.

Jung, W., Yu, O., Lau, S. M., O'Keefe, D. P., Odell, J., Fader, G. and McGonigle, B. (2000) Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. Nature Biotechnol. 18: 208-212.

Kaczor, C.M., Smith, M.W., Sangwan, I. and O'Brian, M.R. (1994) Plant δ-aminolevulinic acid dehydratase. Expression in soybean root nodules and evidence for a bacterial lineage of the Alad gene. Plant Physiol. 104: 1411-1417.

Katagiri, Y., Ibrahim, R.K. and Tahara, S. (2000) HPLC analysis of white lupin isoflavonoids. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 1118-1125.

Kochs, G. and Grisebach, H. (1986) Enzymic synthesis of isoflavones. Eur. J. Biochem. 155: 311-318.

Laurell, H., Contreras, J.A., Castan, I., Langin, D. and Holm, C. (2000) Analysis of the psychrotolerant property of hormone-sensitive lipase through site-directed mutagenesis. Protein Eng. 13: 711-717.

Liu, C.J., Blount, J.W., Steele, C.L. and Dixon, R.A. (2002) Bottlenecks

for metabolic engineering of isoflavone glycoconjugates in *Arabidopsis*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 14578-14583.

Lundqvist, T., Rice, J., Hodge, C.N., Basarab, G.S., Pierce, J. and Lindqvist, Y. (1994) Crystal structure of scytalone dehydratase--a disease determinant of the rice pathogen, *Magnaporthe grisea*. Structure 2: 937-944.

Manco, G., Camardella, L., Febbraio, F., Adamo, G., Carratore, V. and Rossi, M. (2000) Homology modeling and identification of serine 160 as nucleophile of the active site in a thermostable carboxylesterase from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. Protein Eng. 13: 197-200.

Manco, G., Giosue, E., D'Auria, S., Herman, P., Carrea, G. and Rossi, M. (2000) Cloning, overexpression, and properties of a new thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. Arch. Biochem. Biophys. 373: 182-192.

Nakamura, K., Akashi, T., Aoki, T., Kawaguchi, K. and Ayabe, S. (1999). Induction of isoflavonoid and retrochalcone branches of the flavonoid pathway in cultured *Glycyrrhiza echinata* cells treated with yeast extract. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 1618-1620.

Osterlund, T., Danielsson, B., Degerman, E., Contreras, J.A., Edgren, G., Davis, R.C., Schotz, M.C. and Holm, C. (1996) Domain-structure analysis of recombinant rat hormone-sensitive lipase. Biochem J. 319: 411-420.

Pontier, D., Godiard, L., Marco, Y. and Roby, D. (1994) hsr203J, a tobacco

co gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. Plant J. 5: 507-521.

Sankawa, U. and Hakamatsuka, T. (1997) Biosynthesis of isoflavone and related compounds in tissue cultures of *Pueraria lobata*. In Dynamic aspects of natural products chemistry. Molecular biological approaches. Edited by Ogura, K. and Sankawa, U. pp. 25-48. Kodansha/Harwood Academic, Tokyo.

Satoh, T. and Hosokawa, M. (1995) Molecular aspects of carboxylesterase isoforms in comparison with other esterases. Toxicol Lett. 82/83: 439-445.

Sawada, Y., Kinoshita, K., Akashi, T., Aoki, T. and Ayabe, S. (2002) Key amino acid residues required for aryl migration catalyzed by the cytochrome P450 2-hydroxyisoflavanone synthase. Plant J. 31: 555-564.

Song, W.C., Funk, C.D. and Brash, A.R. (1993) Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8519-8523.

Stavric, B. (1997) Chemopreventive agents in foods. In Recent Advances in Phytochemistry. Vol. 31. Functionality of Food Phytochemicals. Edited by Johns, T. and Romeo, J.T. pp. 53-87. Plenum Press, New York.

Steele, C.L., Gijzen, M., Qutob, D. and Dixon, R.A. (1999) Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. Arch. Biochem. Biophys. 367: 146-150.

Tada, S., Volrath, S., Guyer, D., Scheidegger, A., Ryals, J., Ohta, D. and Ward, E. (1994) Isolation and characterization of cDNAs encoding imidazoleglycerolphosphate dehydratase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 105: 579-583.

Tronchet, M., Ranty, B., Marco, Y. and Roby, D. (2001) HSR203 antisense suppression in tobacco accelerates development of hypersensitive cell death. *Plant J.* 27: 115-127.

Walden, A.R., Walter, C. and Gardner, R.C. (1999) Genes expressed in *Pinus radiata* male cones include homologs to anther-specific and pathogenesis response genes. *Plant Physiology*. 121: 1103-1116.

Wei, Y., Contreras, J.A., Sheffield, P., Osterlund, T., Derewenda, U., Kneusel, R.E., Matern, U., Holm, C. and Derewenda, Z.S. (1999) Crystal structure of brefeldin A esterase, a bacterial homolog of the mammalian hormone-sensitive lipase. *Nature Structural Biology*. 6: 340-345.

Welle, R. and Grisebach, H. (1988) Induction of phytoalexin synthesis in soybean: enzymatic cyclization of prenylated pterocarpan to glyceollin isomers. *Arch. Biochem. Biophys.* 263: 191-198.

Yu, O., Jung, W., Shi, J., Croes, R.A., Fader, G.M., McGonigle, B. and O'dell, J.T. (2000) Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiology*. 124: 781-793.

【 0 0 3 9 】

【発明の効果】

以上、本発明では、植物体においてイソフラボンを生産する工程に重要な役割

を果たす脱水酵素を単離し、そのアミノ酸配列およびそれをコードする新規なポリヌクレオチドを提供することができた。さらにまた、本発明は、そのようにして得られた遺伝子をイソフラボンを含むイソフラボノイドの産生に応用することを可能とした。

【0040】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 学校法人 日本大学 Nihon university

<120> 2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチドおよびその応用

<130> 10465

<160> 8

【0041】

<210> 1

<211> 328

<212> PRT

<213> Glycyrrhiza echinata

<400> 1

Met Ala Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Ser Lys Glu Ile Asp Arg Glu

1

5

10

15

Leu Pro Pro Leu Leu Arg Val Tyr Lys Asp Gly Thr Val Glu Arg Phe

20

25

30

Leu Gly Ser Ser Phe Val Pro Pro Ser Pro Glu Asp Pro Glu Thr Gly

35

40

45

Val Ser Thr Lys Asp Ile Val Ile Ser Glu Asn Pro Thr Ile Ser Ala

50

55

60

Arg Val Tyr Leu Pro Lys Leu Asn Asn Thr Thr Glu Lys Leu Pro Ile

65

70

75

80

Leu Val Tyr Tyr His Gly Gly Ala Phe Cys Leu Glu Ser Ala Phe Ser

85

90

95

Phe Leu His Gln Arg Tyr Leu Asn Ile Val Ala Ser Lys Ala Asn Val

100

105

110

Leu Val Val Ser Ile Glu Tyr Arg Leu Ala Pro Glu His Pro Leu Pro

115

120

125

Ala Ala Tyr Glu Asp Gly Trp Tyr Ala Leu Lys Trp Val Thr Ser His

130

135

140

Ser Thr Asn Asn Asn Lys Pro Thr Asn Ala Asp Pro Trp Leu Ile Lys

145

150

155

160

His Gly Asp Phe Asn Arg Phe Tyr Ile Gly Gly Asp Thr Ser Gly Ala

165

170

175

Asn Ile Ala His Asn Ala Ala Leu Arg Val Gly Ala Glu Ala Leu Pro

180

185

190

Gly Gly Leu Arg Ile Ala Gly Val Leu Ser Ala Phe Pro Leu Phe Trp

195

200

205

Gly Ser Lys Pro Val Leu Ser Glu Pro Val Glu Gly His Glu Lys Ser
210 215 220

Ser Pro Met Gln Val Trp Asn Phe Val Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Gly
225 230 235 240

Ile Asp Asn Pro Leu Ile Asn Pro Leu Ala Pro Gly Ala Pro Asn Leu
245 250 255

Ala Thr Leu Gly Cys Pro Lys Met Leu Val Phe Val Ala Gly Lys Asp
260 265 270

Asp Leu Arg Asp Arg Gly Ile Trp Tyr Tyr Glu Ala Val Lys Glu Ser
275 280 285

Gly Trp Lys Gly Asp Val Glu Leu Ala Gln Tyr Glu Gly Glu Glu His
290 295 300

Cys Phe Gln Ile Tyr His Pro Glu Thr Glu Asn Ser Lys Asp Leu Ile
305 310 315 320

Gly Arg Ile Ala Ser Phe Leu Val

【 0 0 4 2 】

<210> 2

<211> 1178

<212> DNA

<213> Glycyrrhiza echinata

<400> 2

ctattccatt cttttccggt ca atg gct tct tca acc tca aca acc act tcc	52
Met Ala Ser Ser Thr Ser Thr Thr Thr Ser	
1 5 10	
aaa gag ata gac agg gag ctt cct cct ctt ctc cgg gtc tac aaa gat	100
Lys Glu Ile Asp Arg Glu Leu Pro Pro Leu Leu Arg Val Tyr Lys Asp	
15 20 25	
gga acc gtg gag cga ttc cta ggc tca tcg ttt gta cca cct tcc cct	148
Gly Thr Val Glu Arg Phe Leu Gly Ser Ser Phe Val Pro Pro Ser Pro	
30 35 40	
gaa gac ccc gaa aca ggg gtt tcc acg aaa gac ata gta atc tca gaa	196
Glu Asp Pro Glu Thr Gly Val Ser Thr Lys Asp Ile Val Ile Ser Glu	
45 50 55	
aac ccc acc atc tct gct cgc gtt tac ctt cca aaa ctg aac aac acc	244
Asn Pro Thr Ile Ser Ala Arg Val Tyr Leu Pro Lys Leu Asn Asn Thr	
60 65 70	
acc gag aag ctc cca atc ttg gtc tac tac cac ggc ggc gcg ttc tgc	292
Thr Glu Lys Leu Pro Ile Leu Val Tyr Tyr His Gly Gly Ala Phe Cys	
75 80 85 90	
ctc gaa tct gct ttc tcc ttc ctc cac caa cgc tac ctc aac atc gtt	340
Leu Glu Ser Ala Phe Ser Phe Leu His Gln Arg Tyr Leu Asn Ile Val	
95 100 105	

gct tcc aag gca aat gtt cta gta gtt tcc atc gag tac agg ctc gcc 388
Ala Ser Lys Ala Asn Val Leu Val Val Ser Ile Glu Tyr Arg Leu Ala
110 115 120

cca gaa cac cct ctt ccg gct gca tat gaa gat ggt tgg tat gct ctc 436
Pro Glu His Pro Leu Pro Ala Ala Tyr Glu Asp Gly Trp Tyr Ala Leu
125 130 135

aaa tgg gtc act tct cat tcc aca aac aac aac aaa ccc acc aac gct 484
Lys Trp Val Thr Ser His Ser Thr Asn Asn Asn Lys Pro Thr Asn Ala
140 145 150

gac cca tgg ttg atc aaa cac ggt gat ttc aac agg ttc tac atc ggg 532
Asp Pro Trp Leu Ile Lys His Gly Asp Phe Asn Arg Phe Tyr Ile Gly
155 160 165 170

ggt gac act tct ggt gca aac att gca cac aat gcg gct ctt cgt gtt 580
Gly Asp Thr Ser Gly Ala Asn Ile Ala His Asn Ala Ala Leu Arg Val
175 180 185

ggt gct gag gcc tta cct ggg ggg ctg aga ata gca ggg gta ctc tct 628
Gly Ala Glu Ala Leu Pro Gly Gly Leu Arg Ile Ala Gly Val Leu Ser
190 195 200

gct ttt cct ctg ttt tgg ggt tct aag cct gtt ttg tca gaa cct gtc 676
Ala Phe Pro Leu Phe Trp Gly Ser Lys Pro Val Leu Ser Glu Pro Val
205 210 215

gag ggg cat gag aag agc tca ccc atg caa gtt tgg aac ttt gtg tac 724

Glu Gly His Glu Lys Ser Ser Pro Met Gln Val Trp Asn Phe Val Tyr
 220 225 230

cca gat gca cca ggt ggc ata gat aac cca cta atc aac cct ttg gca 772
 Pro Asp Ala Pro Gly Gly Ile Asp Asn Pro Leu Ile Asn Pro Leu Ala
 235 240 245 250

cct ggg gct cct aac ttg gcc aca ctt ggg tgt cca aag atg ttg gtc 820
 Pro Gly Ala Pro Asn Leu Ala Thr Leu Gly Cys Pro Lys Met Leu Val
 255 260 265

ttt gtt gcg ggg aag gat gat ctt aga gac aga ggg att tgg tac tat 868
 Phe Val Ala Gly Lys Asp Asp Leu Arg Asp Arg Gly Ile Trp Tyr Tyr
 270 275 280

gag gct gtg aag gaa agt ggg tgg aaa ggg gat gtg gaa ctt gct cag 916
 Glu Ala Val Lys Glu Ser Gly Trp Lys Gly Asp Val Glu Leu Ala Gln
 285 290 295

tat gaa ggg gag gaa cat tgc ttc cag atc tac cat cct gaa act gag 964
 Tyr Glu Gly Glu Glu His Cys Phe Gln Ile Tyr His Pro Glu Thr Glu
 300 305 310

aat tct aaa gat ctc atc ggt cgc atc gct tcc ttc ctt gtt tga acaca 1014
 Asn Ser Lys Asp Leu Ile Gly Arg Ile Ala Ser Phe Leu Val
 315 320 325

cagctagact tcgggttcat tattactagt atgtgatttt gtttgattaa tgttttgtca 1074
 tcaattgatg ggtaataaat tggattaggg tactaggggtt cctgaatcat gctcaatttt 1134

acttttcctg tactattact tgtttatgaa agaattaatg gcat

1178

【 0 0 4 3 】

<210> 3

<211> 319

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 3

Met Ala Lys Glu Ile Val Lys Glu Leu Leu Pro Leu Ile Arg Val Tyr

1

5

10

15

Lys Asp Gly Ser Val Glu Arg Leu Leu Ser Ser Glu Asn Val Ala Ala

20

25

30

Ser Pro Glu Asp Pro Gln Thr Gly Val Ser Ser Lys Asp Ile Val Ile

35

40

45

Ala Asp Asn Pro Tyr Val Ser Ala Arg Ile Phe Leu Pro Lys Ser His

50

55

60

His Thr Asn Asn Lys Leu Pro Ile Phe Leu Tyr Phe His Gly Gly Ala

65

70

75

80

Phe Cys Val Glu Ser Ala Phe Ser Phe Phe Val His Arg Tyr Leu Asn

85

90

95

Ile Leu Ala Ser Glu Ala Asn Ile Ile Ala Ile Ser Val Asp Phe Arg

100 105 110

Leu Leu Pro His His Pro Ile Pro Ala Ala Tyr Glu Asp Gly Trp Thr

115 120 125

Thr Leu Lys Trp Ile Ala Ser His Ala Asn Asn Thr Asn Thr Thr Asn

130 135 140

Pro Glu Pro Trp Leu Leu Asn His Ala Asp Phe Thr Lys Val Tyr Val

145 150 155 160

Gly Gly Glu Thr Ser Gly Ala Asn Ile Ala His Asn Leu Leu Leu Arg

165 170 175

Ala Gly Asn Glu Ser Leu Pro Gly Asp Leu Lys Ile Leu Gly Gly Leu

180 185 190

Leu Cys Cys Pro Phe Phe Trp Gly Ser Lys Pro Ile Gly Ser Glu Ala

195 200 205

Val Glu Gly His Glu Gln Ser Leu Ala Met Lys Val Trp Asn Phe Ala

210 215 220

Cys Pro Asp Ala Pro Gly Gly Ile Asp Asn Pro Trp Ile Asn Pro Cys

225 230 235 240

Val Pro Gly Ala Pro Ser Leu Ala Thr Leu Ala Cys Ser Lys Leu Leu

245

250

255

Val Thr Ile Thr Gly Lys Asp Glu Phe Arg Asp Arg Asp Ile Leu Tyr

260

265

270

His His Thr Val Glu Gln Ser Gly Trp Gln Gly Glu Leu Gln Leu Phe

275

280

285

Asp Ala Gly Asp Glu Glu His Ala Phe Gln Leu Phe Lys Pro Glu Thr

290

295

300

His Leu Ala Lys Ala Met Ile Lys Arg Leu Ala Ser Phe Leu Val

305

310

315

【 0 0 4 4 】

<210> 4

<211> 19

<212> 960

<213> Glycine max

<223> DNA

<400> 4

atg gcg aag gag ata gtg aaa gag ctt ctt cct cta att cga gtg tac 48

Met Ala Lys Glu Ile Val Lys Glu Leu Leu Pro Leu Ile Arg Val Tyr

1

5

10

15

aag gat ggc agc gtg gag cgt ctt cta agc tct gaa aac gtg gca gcc 96

Lys Asp Gly Ser Val Glu Arg Leu Leu Ser Ser Glu Asn Val Ala Ala

20

25

30

tcc cct gaa gat ccc caa act gga gtc tca tcc aaa gac ata gtc atc 144

Ser Pro Glu Asp Pro Gln Thr Gly Val Ser Ser Lys Asp Ile Val Ile

35

40

45

gca gac aac ccc tac gtc tcc gct cgc att ttc ctt ccc aaa tcc cac 192

Ala Asp Asn Pro Tyr Val Ser Ala Arg Ile Phe Leu Pro Lys Ser His

50

55

60

cac act aac aac aaa ctc ccc atc ttc ctc tac ttc cac ggt ggc gcc 240

His Thr Asn Asn Lys Leu Pro Ile Phe Leu Tyr Phe His Gly Gly Ala

65

70

75

80

ttt tgc gtc gaa tcc gcc ttc tcc ttt ttc gtc cac cgc tat ctc aac 288

Phe Cys Val Glu Ser Ala Phe Ser Phe Phe Val His Arg Tyr Leu Asn

85

90

95

atc ttg gcc tca gaa gcc aac ata ata gcc atc tcc gtc gac ttc aga 336

Ile Leu Ala Ser Glu Ala Asn Ile Ile Ala Ile Ser Val Asp Phe Arg

100

105

110

ctc ctc cca cac cac cct atc cct gct gcc tac gaa gac ggt tgg acc 384

Leu Leu Pro His His Pro Ile Pro Ala Ala Tyr Glu Asp Gly Trp Thr

115

120

125

acc ctc aaa tgg att gct tcc cac gcc aac aac acc aac acc acc aac 432

Thr Leu Lys Trp Ile Ala Ser His Ala Asn Asn Thr Asn Thr Thr Asn

130

135

140

ccg gag cca tgg cta ctc aac cac gcc gac ttc acc aaa gtc tac gta 480
 Pro Glu Pro Trp Leu Leu Asn His Ala Asp Phe Thr Lys Val Tyr Val
 145 150 155 160

gga ggt gaa acc agc ggt gct aac atc gca cac aac ctg ctt ttg cgt 528
 Gly Gly Glu Thr Ser Gly Ala Asn Ile Ala His Asn Leu Leu Leu Arg
 165 170 175

gca ggt aac gaa tcc ctc ccc ggg gat ctg aaa ata ttg ggt gga tta 576
 Ala Gly Asn Glu Ser Leu Pro Gly Asp Leu Lys Ile Leu Gly Gly Leu
 180 185 190

cta tgc tgc ccc ttc ttc tgg ggc tcg aag cca att ggg tcg gag gct 624
 Leu Cys Cys Pro Phe Phe Trp Gly Ser Lys Pro Ile Gly Ser Glu Ala
 195 200 205

gtt gag ggg cac gag cag agt ttg gcc atg aag gtc tgg aac ttt gcc 672
 Val Glu Gly His Glu Gln Ser Leu Ala Met Lys Val Trp Asn Phe Ala
 210 215 220

tgc cct gat gcc ccc ggt gga atc gat aac ccc tgg atc aac ccc tgt 720
 Cys Pro Asp Ala Pro Gly Gly Ile Asp Asn Pro Trp Ile Asn Pro Cys
 225 230 235 240

gtt cct ggg gca ccc tct ttg gcc act ctt gcc tgc tct aag ttg ctc 768
 Val Pro Gly Ala Pro Ser Leu Ala Thr Leu Ala Cys Ser Lys Leu Leu
 245 250 255

gtt act atc act ggc aaa gac gag ttc aga gac aga gat att ctc tac 816

Val Thr Ile Thr Gly Lys Asp Glu Phe Arg Asp Arg Asp Ile Leu Tyr
260 265 270

cac cac acc gtt gag caa agt ggc tgg caa ggt gaa ctt caa ctc ttt 864
His His Thr Val Glu Gln Ser Gly Trp Gln Gly Glu Leu Gln Leu Phe
275 280 285

gat gct ggc gat gag gag cat gct ttc cag ctc ttc aag cct gag act 912
Asp Ala Gly Asp Glu Glu His Ala Phe Gln Leu Phe Lys Pro Glu Thr
290 295 300

cat ctt gct aaa gcc atg atc aaa cgc ttg gct tct ttt ctg gtt tga 960
His Leu Ala Lys Ala Met Ile Lys Arg Leu Ala Ser Phe Leu Val
305 310 315

【 0 0 4 5 】

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

gtcatatggc gaaggagata gtgaa 25

【 0 0 4 6 】

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

agggatccat caaaccagaa aaga 24

【0047】

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

gtcatatggc ttcttcaacc tcaac 25

【0048】

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

ctggatcctc aaacaaggaa ggaag 25

【図面の簡単な説明】

【図1】

フラバノンからイソフラボノイドの生成経路を示す説明図。

【図2】

カンゾウ細胞の2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするcDNAクローニングの説明図。

【図3】

図3Aは、カンゾウおよびダイズの2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼのアミノ酸配列を示す。(G. echinata Dehydratase = カンゾウHIDM, Soybean TC98460 = ダイズHIDH)

図3Bは、カンゾウなどマメ科植物の遺伝子の分子系統樹を示す。

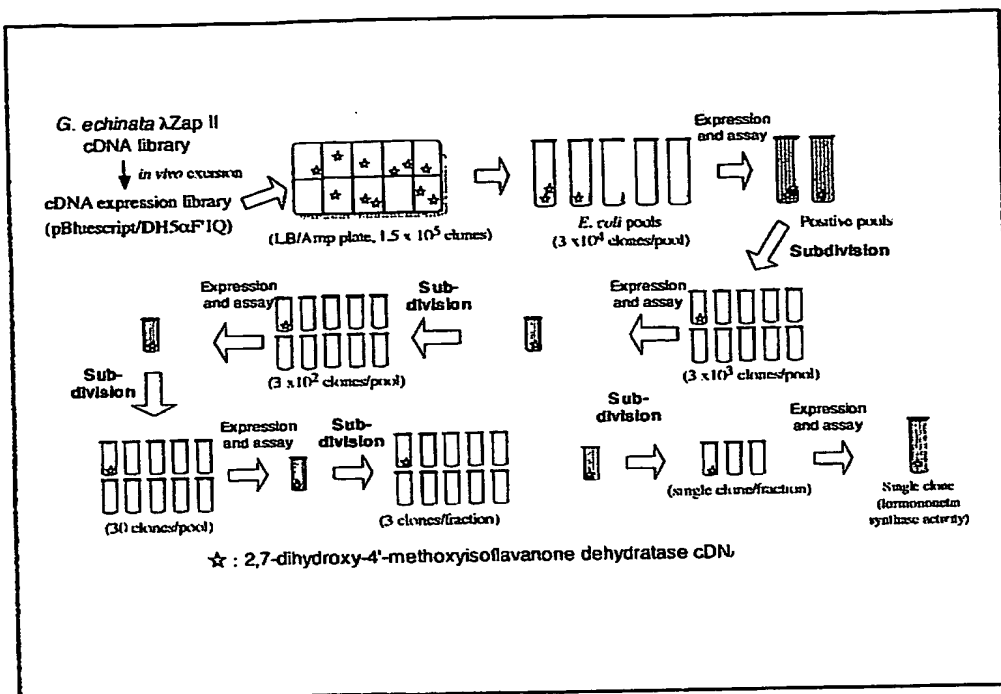
【図4】

2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼ生成物のHPLCプロファイルを
示す。

【図5】

遺伝子発現レベルを示すRT-PCR分析パターンを示す。

【図2】



【図 3】

(A)

G. echinata Dehydratase
Soybean TC98460

1 HMASSTSTTSKEIDRELPLLRVYKDGTVVERFLGSSFWPPSPEDPETGVSTKDIVISEN
1 HMAKEIVK----EL---LP-LTRVYKDGSEVERLLSENMAASPEDPOTGVSSKDIVIAON

G. echinata Dehydratase
Soybean TC98460

61 PTISARVYLPKLNNITTEKLPLVYVHGGAFQLESASFSLHORYLHTVASKANVLVVSTIEY
53 PYVSARITFLPKSHHTNNKLPIFLYHGGAFQVESAFSFFVHRYLHTLASEANIIAISVDF

G. echinata Dehydratase
Soybean TC98460

121 RLAPENFLPAAYEDGMYALKWYTSSTNNKPTNADPWLIKCDHRRFYIGGDTSGANIA
113 RLLPMHPIPAAYEDGWTTLKNTAS-ANNTNTNP-EPWLLMHADFTKVYVGGETSGAHIA*

G. echinata Dehydratase
Soybean TC98460

181 HNAALRVGAELPGGLRIAGVLSAFPLFWGSKFVLEPVEGHEKSSPHQVWNFVYPDAG
172 HNLILRAGNESLPGLKILGLCCPFWGSKPIGSEAVEGHEQSLAKVWNFACPDAPG

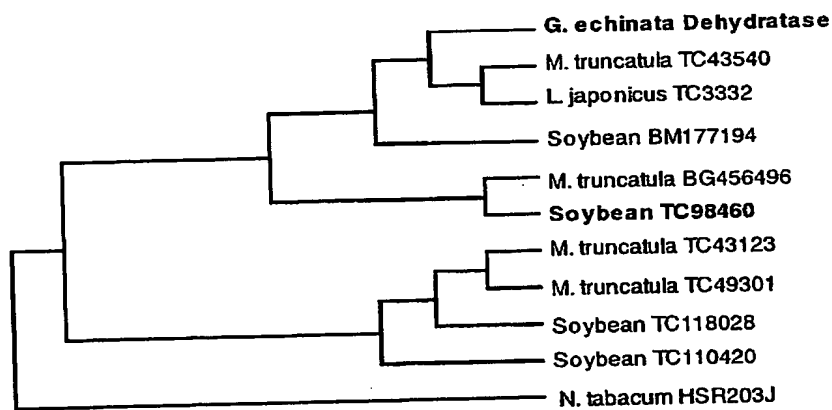
G. echinata Dehydratase
Soybean TC98460

241 GIDNPLINFLAPGAFNLATLGGPKMLVFVAGKDDLDRDGLWYEAVKESGAKGDVELAQY
232 GIDNFWINPCVPGAPSLATLACSKLLVTITGKDEFDRDGLVHHTVEQSGHQGELQLFDA*

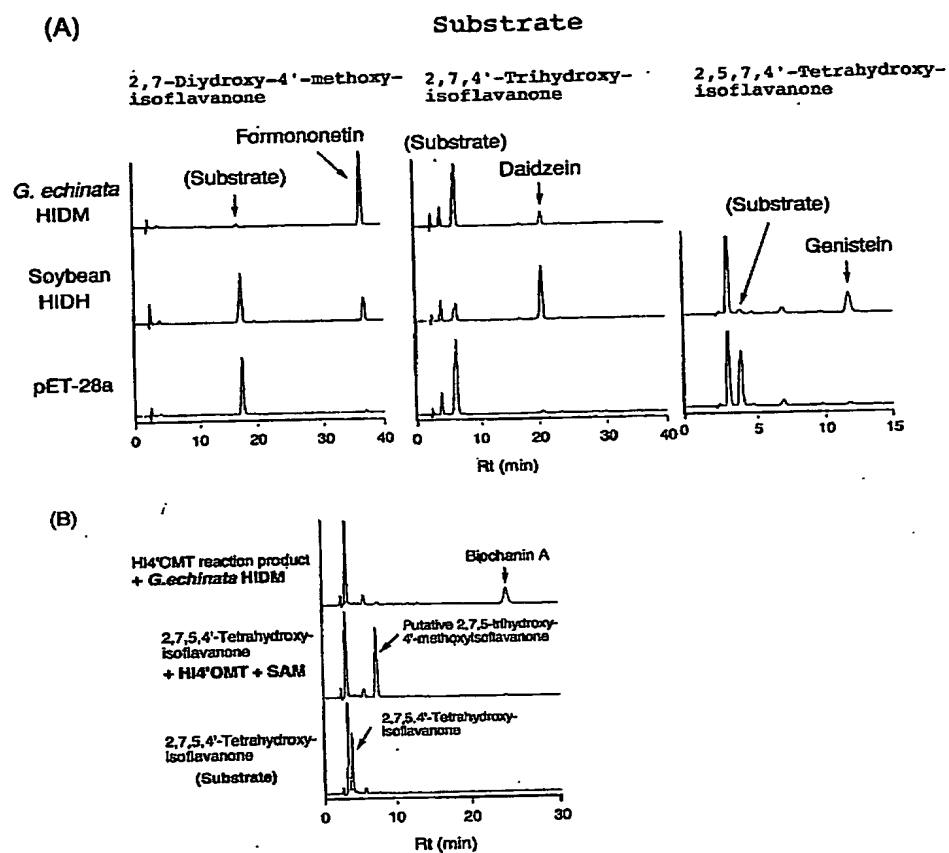
G. echinata Dehydratase
Soybean TC98460

301 EGEEHCFQIYHPETENSKDLTGRIASFLVGS
292 GDEEHAFLFKPETHLAKAMTKRIASFLVWI*

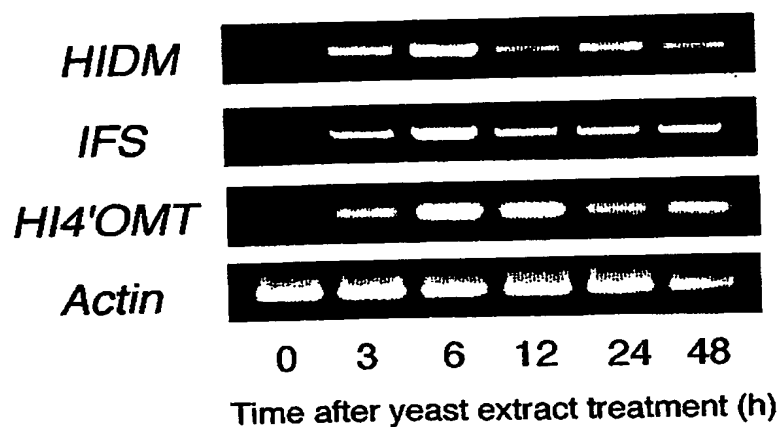
(B)



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 2-ヒドロキシイソフラバノンからイソフラボンへの脱水反応を触媒する2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼのアミノ酸構造を決定し、それをコードする遺伝子を提供すること。

【解決手段】 カンゾウから配列番号1で表わされるアミノ酸配列を実質的に有する2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼが単離された。また、配列番号2の2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチドが取得できた。また、ダイズからも2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼのアミノ酸配列を同定、2-ヒドロキシイソフラバノンデヒドラターゼをコードするポリヌクレオチドが取得できた。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-092337
受付番号	50300520864
書類名	特許願
担当官	鈴木 夏生 6890
作成日	平成15年 4月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 3月28日

次頁無

特願 2003-092337

出願人履歴情報

識別番号

[899000057]

1. 変更年月日

1999年 9月17日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都千代田区九段南四丁目8番24号

氏名

学校法人日本大学